

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

09. 7. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 6 月 2 5 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 1 8 1 3 4 2  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 3 - 1 8 1 3 4 2 ]

出 願 人  
Applicant(s): 日本油脂株式会社

REC'D 29 JUL 2004

WIPO

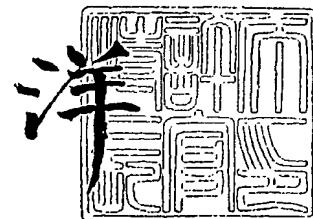
PCT

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 7 月 7 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願

【整理番号】 32015005

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 30/00

【発明者】

    【住所又は居所】 山梨県甲府市和田町 6 5 4 - 6

    【氏名】 黒澤 尋

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市梅園 2 - 1 5 - 5

    【氏名】 榊 秀次郎

【特許出願人】

    【識別番号】 000004341

    【氏名又は名称】 日本油脂株式会社

    【代表者】 中嶋 洋平

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 002370

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

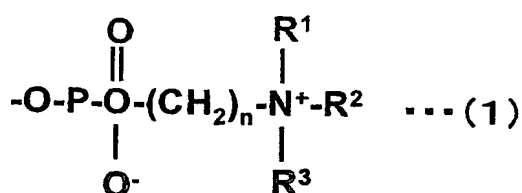
【書類名】 明細書

【発明の名称】 胚様体形成容器及び胚様体形成方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 胚性幹細胞を浮遊培養させ胚様態を形成させるために使用される胚様態形成容器において、胚性幹細胞及び／又は胚様態と接する容器の表面が下記式（1）で表されるホスホリルコリン類似基により被覆された構造である胚様態形成容器。

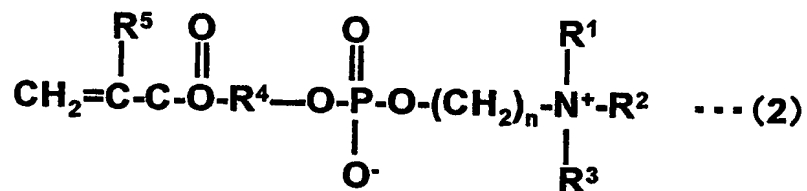
【化 1】



（ただし、式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ は同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数 1～6 のアルキル基またはヒドロキシアルキル基を示す。 $n$  は 1～4 の整数である。）

【請求項 2】 前記ホスホリルコリン類似基により被覆された構造が、下記式（2）で表されるホスホリルコリン類似基含有単量体の単独重合体又は他の単量体との共重合体から形成される構造である請求項 1 記載の胚様体形成容器。

【化 2】



（ただし、式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ は同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数 1～6 のアルキル基またはヒドロキシアルキル基を示し、 $\text{R}^4$ は炭素数 1～6 のアルキル基を示し、 $\text{R}^5$ は水素原子もしくはメチル基を示す。 $n$  は 1～4 の整数である。）

【請求項 3】 胚性幹細胞及び／又は胚様態と接する胚様体形成容器の表面において、X線高電子分光分析によって測定したスペクトルにおける、リン元素の量

Pと炭素元素の量Cとの比（ $P/C$ ）が0.002～0.3である請求項1又は2記載の胚様体形成容器。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項に記載の胚様体形成容器中で、胚性幹細胞を浮遊培養することを特徴とする胚様体形成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、胚様体形成に用いる胚様体形成容器及び、胚様体形成方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

胚性幹細胞（以下、ES細胞と略記する）は試験管内でも様々な細胞に分化する能力をもつ。ES細胞を試験管内で分化させる方法として、浮遊培養によって胚様体と呼ばれる擬似的な胚を形成させる方法や、ストロマ細胞のように分化と増殖を支持する細胞と共培養する方法などが利用されている。

ES細胞をLIF（白血病阻止因子：leukemia inhibitory factor）を加えずに高密度になるまで培養し、培養シャーレなどの培養容器に接着しないようにした浮遊培養で細胞塊を形成させるとその後、さまざまな種類の細胞に分化することが知られている。浮遊培養で形成された細胞塊は胚様体（EB）と呼ばれ、浮遊培養はES細胞を試験管内で分化させる際に最も広く用いられる方法である。

【0003】

胚様体は二重の細胞層から成るボールのような構造をもち、外層は近位内胚葉、内層は胚体外胚葉にあたる。2つの胚葉は基底膜によって隔てられている。この構造はマウスの6日胚である円筒胚によく似ており、その限りにおいて胚の正常な発生段階に近い。胚様体の中では中胚葉の誘導も起き、心筋細胞や血液細胞、さらには原始的な血管網も発生する。また、胚様体を培養シャーレに付着させてさらに培養を続けると様々な種類の細胞に分化する。この中には、神経細胞、ケラチノサイト、軟骨細胞、脂肪細胞などが含まれる。胚様体形成を経て分化す

る細胞は体細胞に限らず、最近では生殖細胞系譜への分化も起きることが確認されている。このように胚様体の形成（E B の形成）は E S 細胞の多分化能を示すのに都合がよい。

#### 【 0 0 0 4 】

胚様体を形成させる為には、E S 細胞を培養容器に接着しないように工夫した「ハンギング・ドロップ法」が広く用いられている。ガラス容器のふたから垂れ下がった水滴の中に E S 細胞を入れて培養したり（ハンギング・ドロップ法 1）、あるいは、培養容器に予めミネラルオイルを入れておき、その上に E S 細胞を重層し培養する（ハンギング・ドロップ法 2）が知られている。しかしながら、ハンギング・ドロップ法は、垂れ下がった水滴が落ちないように、あるいは重層したミネラルオイルと細胞懸濁液の界面が乱れないようにしなくてはならず、培養時の調製・扱いが非常に煩雑であった。また、ミネラルオイルを用いたハンギング・ドロップ法 2 では胚様体形成後に、胚様体を別の培養容器に移すまで検鏡することが出来ず、胚様体形成過程の研究開発が非常に困難であった。

#### 【 0 0 0 5 】

一方、医療用材料の研究のなかで、ホスホリルコリン基含有重合体は、生体膜に由来するリン脂質類似構造に起因して、血液適合性、補体活性、生体物質非吸着性等の特性を有していることが明らかにされ、こうした機能を利用した生体関連材料の開発が盛んに行われている。具体的には、例えば、特許文献 1 には、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（以下 MPC と略記する）の製造方法とその重合体が優れた生体適合性を有することが開示されており、特許文献 2 には、MPC とメタクリル酸エステルとの共重合体が血小板の粘着・凝集や血漿蛋白質の付着が起りにくく、医療用材料として有用であることが開示されている。更に、特許文献 3 には、ホスホリルコリン類似基を側鎖に有する共重合体を用いた医療用材料が開示されており、特許文献 4、及び特許文献 5 には、ホスホリルコリン類似基を有する重合体を樹脂表面にコーティングして、優れた生体適合性が得られることが開示されている。更に別に、特許文献 6 には、ホスホリルコリン類似基を有する重合体をポリエチレンテレフタレートにコーティングして、血球細胞、株細胞及び、初代培養細胞を分離・回収する分離剤及び、分離

・回収方法が開示されている。

しかし、胚性幹細胞の浮遊培養に使用するホスホリルコリン類似基を有する重合体を被覆した胚様態形成容器は知られていない。

#### 【0006】

【特許文献1】特開昭54-36025号公報（第1頁）

【特許文献2】特開平3-39309号公報（第2頁）

【特許文献3】特開平9-183819号公報（第2頁）

【特許文献4】特表平6-502200号公報（第2頁）

【特許文献5】特表平7-502053号公報（第2頁）

【特許文献6】特開2002-098676号広報（第2頁）

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は下記の課題を解決することを目的とする。

本発明の目的の第1は、煩雑な手法を用いることなく、容易に胚性幹細胞より胚様体を形成するために使用する胚様体形成容器を提供することにある。

本発明の目的の第2は、煩雑な手法を用いることなく、容易に胚性幹細胞を培養し胚様体を形成できる胚様体形成方法を提供することにある。

#### 【0008】

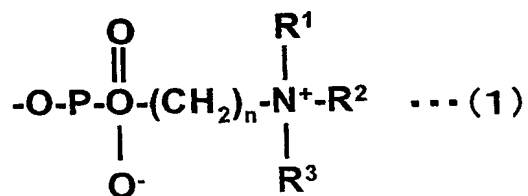
【課題を解決するための手段】

本発明は以下の（1）～（4）である。

（1） 胚性幹細胞を浮遊培養させ胚様態を形成させるために使用される胚様態形成容器において、胚性幹細胞及び／又は胚様態と接する容器の表面が下記式（1）で表されるホスホリルコリン類似基により被覆された構造である胚様態形成容器。

#### 【0009】

## 【化3】



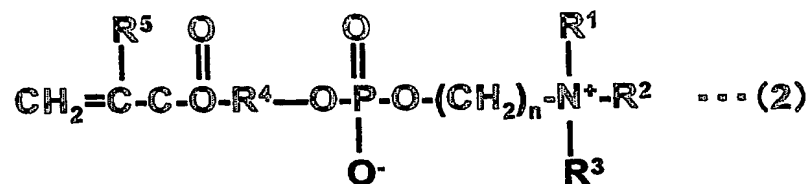
(ただし、式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ は同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数1～6のアルキル基またはヒドロキシアルキル基を示す。 $n$ は1～4の整数である。)

## 【0010】

(2) 前記ホスホリルコリン類似基により被覆された構造が、下記式(2)で表されるホスホリルコリン類似基含有単量体の単独重合体又は他の単量体との共重合体から形成される構造である前記(1)の胚様体形成容器。

## 【0011】

## 【化4】



## 【0012】

(ただし、式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ および $\text{R}^3$ は同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数1～6のアルキル基またはヒドロキシアルキル基を示し、 $\text{R}^4$ は炭素数1～6のアルキル基を示し、 $\text{R}^5$ は水素原子もしくはメチル基を示す。 $n$ は1～4の整数である。)

## 【0013】

(3) 胚性幹細胞及び／又は胚様態と接する胚様体形成容器の表面において、X線高電子分光分析によって測定したスペクトルにおける、リン元素の量 $P$ と炭素元素の量 $C$ との比( $P/C$ )が0.002～0.3である前記(1)又は(2)の胚様体形成容器。

## 【0014】

(4) 前記(1)～(3)のいずれかの胚様体形成容器中で、胚性幹細胞を浮遊培養することを特徴とする胚様体形成方法。

#### 【0015】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、胚性幹細胞を浮遊培養させ胚様態を形成させるために使用される胚様態形成容器であって、胚性幹細胞及び／又は胚様態と接する容器の表面が前記式(1)で表されるホスホリルコリン類似基により被覆された構造であることを特徴とする。

#### 【0016】

ここで、式(1)中の $R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ は、同一もしくは異なる基であって、水素原子、炭素数1～6のアルキル基またはヒドロキシアルキル基であり、炭素数1～6のアルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、シクロヘキシル基、フェニル基等が挙げられ、炭素数1～6のヒドロキシアルキル基としては、例えば、ヒドロキシメチル基、2-ヒドロキシエチル基、3-ヒドロキシプロピル基、4-ヒドロキシブチル基、5-ヒドロキシペンチル基、6-ヒドロキシヘキシル基等が挙げられる。

#### 【0017】

容器の表面を前記式(1)で表されるホスホリルコリン類似基により被覆された構造とする方法としては、例えば、ホスホリルコリン類似基を有する反応試薬を用いた基材表面への化学修飾法、ホスホリルコリン類似基を有するポリマーの基材表面へのコーティング法、ホスホリルコリン類似基を有するポリマーの基材表面への化学結合法の方法が挙げられる。

なかでも、ポリマーのコーティング法は、簡便に均一にホスホリルコリン類似基により被覆された構造を構築できるので適している。

コーティングに用いられるポリマーは、前記式(1)で表されるホスホリルコリン類似基を有するポリマーであれば、いずれのポリマーを使用することができるが、本発明において、前記式(2)で表されるホスホリルコリン類似基含有単量体の単独重合体又は他の単量体との共重合体であることが好ましい。

#### 【0018】



前記式(2)で表されるホスホリルコリン類似基含有単量体としては、例えば、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)、3-((メタ)アクリロイルオキシ)プロピル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)、4-((メタ)アクリロイルオキシ)ブチル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)、5-((メタ)アクリロイルオキシ)ペンチル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)、6-((メタ)アクリロイルオキシ)ヘキシル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)、

#### 【0019】

2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリエチルアンモニオ)エチルホスフェート)、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリプロピルアンモニオ)エチルホスフェート)、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリブチルアンモニオ)エチルホスフェート)、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリシクロヘキシルアンモニオ)エチルホスフェート)、2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリフェニルアンモニオ)エチルホスフェート)、

#### 【0020】

2-((メタ)アクリロイルオキシ)プロピル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)、2-((メタ)アクリロイルオキシ)ブチル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)、2-((メタ)アクリロイルオキシ)ペンチル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)、2-((メタ)アクリロイルオキシ)ヘキシル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)等が挙げられる。

#### 【0021】

この中でも2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート)が好ましく、さらに2-((メタ)アクリロイルオキシ)エチル-2'-((トリメチルアンモニオ)エチルホスフェート) (2-メタアクリロイルオキシエチルホスホリルコリンともいう。以下、MPCと略記する)が入手性および胚性幹細胞の培養容器への接着を防止でき胚様体形成能を発現させ

る点でより好ましい。

#### 【0022】

前記式(2)で表されるホスホリルコリン類似基含有単量体の単独重合体又は他の単量体との共重合体は、ホスホリルコリン類似基含有単量体を単独であるいは他の単量体との混合液を重合して得ることができる。

#### 【0023】

共重合体を得るための他の単量体としては、疎水性単量体及び、2-ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、2-ヒドロキシブチル(メタ)アクリレート、4-ヒドロキシブチル(メタ)アクリレート等の水酸基含有(メタ)アクリレート；アクリル酸、メタクリル酸、スチレンスルホン酸、(メタ)アクリロイルオキシホスホン酸、2-ヒドロキシ-3-(メタ)アクリルオキシプロピルトリメチルアンモニウムクロライド等のイオン性基含有単量体；(メタ)アクリルアミド、アミノエチルメタクリレート、ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート等の含窒素単量体；ポリエチレングリコール(メタ)アクリレート、グリシジル(メタ)アクリレート等が挙げられ、これらの1種類または2種類以上が用いられる。

#### 【0024】

疎水性単量体としては、例えば、メチル(メタ)アクリレート、エチル(メタ)アクリレート、ブチル(メタ)アクリレート、2-エチルヘキシル(メタ)アクリレート、ラウリル(メタ)アクリレート、ステアリル(メタ)アクリレート等の直鎖または分岐アルキル(メタ)アクリレート；シクロヘキシル(メタ)アクリレート等の環状アルキル(メタ)アクリレート；ベンジル(メタ)アクリレート、フェノキシエチル(メタ)アクリレート等の芳香族(メタ)アクリレート；ポリプロピレングリコール(メタ)アクリレート等の疎水性ポリアルキレングリコール(メタ)アクリレート；スチレン、メチルスチレン、クロロメチルスチレン等のスチレン系単量体；メチルビニルエーテル、ブチルビニルエーテル等のビニルエーテル系単量体；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル等のビニルエステル系単量体等が挙げられ、これらの1種類または2種類以上が用いられる。

#### 【0025】

共重合体を使用する場合、疎水性単量体に由来する構成単位はポリマーの構成単位中 90 モル%以下であることが好ましい。疎水性単量体に由来する構成単位がポリマーの構成単位中に含まれると、ポリマーの耐溶出性が向上するが、その構成単位が 90 モル%を超えると、容器の表面の前記式 (1) で表されるホスホリルコリン類似基の被覆量が少なくなり、被覆の効果が十分に発揮できなくなる。疎水性単量体に由来する構成単位はポリマーの構成単位中に 20 モル%以上含まれることがより好ましい。

上述の疎水性単量体以外の単量体に由来する構成単位がポリマーの構成単位中に含まれると耐溶出性を向上させ、培地等に界面活性剤、有機溶剤を使用できることになるので好ましい。

例えば、グリシジル (メタ) アクリレートを用いた場合は、容器の表面のアミノ基、カルボキシル基などと反応させると、ホスホリルコリン類似基を有するポリマーを、胚様態形成容器の表面に化学的に結合させることができるのでより好ましい。

疎水性単量体以外の単量体に由来する構成単位はポリマーの構成単位中に 70 モル以下含ませることができる。

#### 【0026】

本発明に使用する、前記式 (2) で表されるホスホリルコリン類似基含有単量体の単独重合体又は他の単量体との共重合体の分子量は、重量平均分子量で、5,000~5,000,000 の範囲がよく、胚性幹細胞の培養容器への接着を防止でき胚様体形成能を発現させるので、またポリマーの耐溶出性を向上させるので、さらに望ましくは 100,000~2,000,000 の範囲である。

#### 【0027】

本発明において、前記式 (1) で表されるホスホリルコリン類似基による胚様体形成容器基板への表面の被覆の程度は、表面分析方法により評価できる。

具体的には、さらに、X線光電子分光分析によって測定したスペクトルにおける、リンのピーク面積 P と炭素のピーク面積 C の比、すなわち  $P/C$  の値で評価することができ、 $P/C$  の値が 0.002~0.3 の範囲であることが好ましい。胚様体形成能を発現させるためには、より好ましくは、 $P/C$  の値が 0.01

～ 0. 2 の範囲である。

#### 【0028】

本発明の胚様体形成容器は特に限定されるものではないが、細胞培養用ディッシュ、細胞培養用マルチディッシュ、細胞培養用プレート、細胞培養用バック、細胞培養用フラスコなどの既存の細胞培養容器が挙げられる。適度な大きさの胚様体を得るために、更に望ましくは、細胞培養用ディッシュあるいは、細胞培養用プレートが挙げられる。

胚様体形成容器の材質は、特に限定されないが、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、アクリル樹脂、ガラス、金属等が挙げられ、また、前記材質でコロナ処理等の表面加工した材質も好ましく挙げられる。

#### 【0029】

前記(2)で表されるホスホリルコリン類似基含有単量体の単独重合体又は他の単量体との共重合体は、胚様体形成容器の表面に容易に被覆することができる。

具体的にはポリマーを、水、エタノール、メタノール、イソプロパノールなどに単独に溶解あるいは、水とエタノール、エタノールとイソプロパノールなどの混合溶剤に溶解した後に、培養容器を浸漬あるいは、培養容器にポリマー溶液をスプレーすることによりポリマーをコーティングし胚様体形成容器を得ることができる。

また、ポリマーにエポキシ基、イソシアネート基、スクシンイミド基、アミノ基、カルボキシル基、水酸機などの化学結合が可能な官能基を有する場合には、基材表面のアミノ基、カルボキシル基、水酸機と化学反応させるために、ポリマー溶液を化学結合可能な官能基が反応しない溶剤に溶解し、培養容器表面と化学結合させ被覆した後に、未反応のポリマーを洗浄除去し、胚様体容器を得ることができる。

#### 【0030】

本発明の胚様体形成方法は、フィーダー細胞上で培養した未分化状態の胚性幹細胞(ES細胞)を、本発明の胚様体形成容器で培養するだけで容易に胚様体を得ることができるが、その際に胚様体形成容器を静置しても、緩やかにし振とう

してもよい。

本発明の胚様体形成容器を用いて胚性幹細胞（ES細胞）より胚様体を形成させる際の培地は、従来のハンギング・ドロップ法などに用いられている各種成長因子、Iscove's modified Dulbecco's medium（IMDM培地）などを用いることができる。

ES細胞濃度は、胚様体形成容器の大きさによって異なるが、 $1.0 \times 10^2$  cells/mL  $\sim$   $1.0 \times 10^6$  cells/mLである。胚様体形成容器を96穴プレートとする際には、 $1.0 \times 10^3$  cells/mL  $\sim$   $1.0 \times 10^5$  cells/mLが、再現性良く胚様体形成ができるので好ましい。

#### 【0031】

##### 【発明の効果】

以下に、本発明の効果を従来技術と対比してまとめる。

従来のハンギング・ドロップ法は、胚性幹細胞の培養において、垂れ下がった水滴が落ちないように、あるいは重層したミネラルオイルと細胞懸濁液の界面が乱れないようにしなくてはならず、培養時の調製・扱いが非常に煩雑であった。

また、ミネラルオイルを用いたハンギング・ドロップ法では胚様体形成後に、胚様体を別の培養容器に移すまで検鏡することができず、胚様体形成過程における研究開発が非常に難しかった。

本発明の胚様体形成容器を使用すると、このような煩雑な手法を用いることなく、容易に胚性幹細胞より胚様体を形成することができる。

さらに、本発明の胚様体形成方法では、煩雑な手法を用いることなく、容易に胚性幹細胞を培養でき、効率よく胚様体を形成することができる。

#### 【0032】

##### 【実施例】

以下、実施例に基づいて、本発明をさらに詳細に説明する。なお、以下の方法により、表面のP/Cの値を算出した。

#### 【0033】

胚様体形成容器表面の測定方法

本発明で用いている表面に存在する炭素元素に対するリン元素の割合であるP

／Cの値を求めるために、X線光電子分光分析（ESCA-3300，島津製作所）を用いて、X線の照射角が90°のときの各元素のスペクトルを測定し、リン元素および炭素元素のピーク面積から、式（1）によりP／Cの値を算出した。

$$P/C = A_p / A_c \quad \text{式（1）}$$

ただし、 $A_p$ ：リン元素のピーク面積、 $A_c$ ：炭素元素のピーク面積とする。

#### 【0034】

##### 合成例1

MPC（35.7 g）及び、*n*-ブチルメタクリレート（4.3 g、BMAと略記する。）（単量体組成モル比、MPC／BMA＝80／20）をエタノール（160 g）に溶解して4つ口フラスコに入れ、30分間窒素を吹き込んだ後、60℃でアゾビスイソブチロニトリル（0.82 g）を加えて8時間重合反応させた。重合液を3 Lのジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48時間室温で真空乾燥を行って、粉末（29.6 g）を得た。GPCにより測定した分子量は重量平均分子量153,000であった。<sup>1</sup>H-NMRにて組成分析した結果は、MPC／BMA＝80／20（モル比）であった。これを共重合体Aとする。

なお、GPCの測定条件は、以下の通りである。

（1）試料：試料を0.5質量％臭化リチウムを含むクロロホルム／メタノール（＝6／4、体積／体積）混合溶媒に溶解し、0.5質量％の重合体溶液を調整した。試料溶液使用量は20 μLである。

（2）カラム：PL gel 5 μm MIXED C-C、2本直列（ポリマー・ラボラトリー社製）、カラム温度は40℃、東ソー社製インテグレーター内蔵分子量計算プログラム（SC-8020用GPCプログラム）にて調整した。

（3）溶出溶媒：0.5質量％臭化リチウムを含むクロロホルム／メタノール（＝6／4、体積／体積）混合溶媒、流速は1.0 mL／分である。

（3）検出：示差屈折計、

（4）標準物質：ポリメチルメタクリレート（PMMA）（ポリマー・ラボラトリー社製）。

## 【0035】

## 合成例 2

MPC (38.0 g) 及び、グリシジルメタクリレート (2.0 g、GMA と略記する。) (単量体組成モル比, MPC/GMA=90/10) をイソプロパノール (358 g) に溶解して 4 つ口フラスコに入れ、30 分間窒素を吹き込んだ後、60℃で 20 質量% t-ブチルパーオキシピバレートのトルエン溶液 (2.18 g) を加えて 5 時間重合反応させた。重合液を 3 L のジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48 時間室温で真空乾燥を行って、粉末 (28.4 g) を得た。<sup>1</sup>H-NMR にて組成分析した結果は、MPC/GMA=90/10 (モル比) であった。GPC により測定した分子量は重量平均分子量 53,000 であった。これを共重合体 B とする。

## 【0036】

## 合成例 3

MPC (12.6 g)、BMA (8.6 g) 及び、GMA (6.0 g) (単量体組成モル比, MPC/BMA/GMA=30/40/30) をイソプロパノール (358 g) に溶解して 4 つ口フラスコに入れ、30 分間窒素を吹き込んだ後、60℃で 20 質量% t-ブチルパーオキシピバレートのトルエン溶液 (2.18 g) を加えて 5 時間重合反応させた。重合液を 3 L のジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿を濾過し、48 時間室温で真空乾燥を行って、粉末 (28.4 g) を得た。<sup>1</sup>H-NMR にて組成分析した結果は、MPC/BMA/GMA=30/40/30 (モル比) であった。GPC により測定した分子量は重量平均分子量 42,000 であった。これを共重合体 C とする。

## 【0037】

## 実施例 1-1

合成例 1 により合成した共重合体 A (0.5 g) をエタノール (100 mL) に溶解し、共重合体溶液を調製した。U 底ポリスチレン製 96 穴プレートの各ウェルに前記の共重合体溶液 (0.3 mL) を入れた後、各ウェルから共重合体溶液を吸引し除去した。50℃で 5 時間減圧下で乾燥することにより胚様体形成容器 A を作製した。

調製した胚様体形成容器Aは、前記の測定方法を用いて、P/C値を測定した。測定結果を表1に示した。

#### 【0038】

##### 実施例1-2

U底ポリスチレン製96穴プレートを空气中でコロナ処理（照射エネルギー  $1 \text{ J/cm}^2$ ）して表面にカルボキシル基を生成させた。合成例2により合成した共重合体B（0.5 g）をイソプロパノール（100 mL）に溶解し、共重合体溶液を調製した。コロナ処理したU底96穴プレートの各ウェルに前記の共重合体溶液（0.3 mL）を入れた後、各ウェルから共重合体溶液を吸引し除去した。60℃で3時間、プレート表面のカルボキシル基と共重合体中のエポキシ基を反応させた。0.2 Mチオ硫酸ナトリウム水溶液を、各ウェルに0.3 mL入れて、25℃、24時間、未反応のエポキシを開環した。蒸留水で各ウェルを3回洗浄した後、50℃で5時間減圧下で乾燥することにより胚様体形成容器Bを作製した。

調製した胚様体形成容器Bは、前記の測定方法を用いて、P/C値を測定した。測定結果を表1に示した。

#### 【0039】

##### 実施例1-3

実施例1-2で用いた合成例2により合成した共重合体Bの代わりに、合成例3により合成した共重合体Cを用いた以外は実施例1-2と同様に行い、胚様体形成容器Cを作製した。

調製した胚様体形成容器Cは、前記の測定方法を用いて、P/C値を測定した。測定結果を表1に示した。

#### 【0040】

##### 比較例1

未処理のU底ポリスチレン製96穴プレートを、前記の測定方法を用いて、P/C値を測定した。測定結果を表1に示した。

#### 【0041】



【表 1】

表 1

	容 器	P/C
実施例 1-1	胚様体形成容器 A	0.038
実施例 1-2	胚様体形成容器 B	0.074
実施例 1-3	胚様体形成容器 C	0.038
比較例	未処理プレート	0.000

【0042】

## 実施例 2-1

下記の調製方法で調整した  $2 \times 10^4$  cells/mL のマウス ES 細胞懸濁液を実施例 1-1 で作製した胚様体形成容器 A に各ウェル 0.2 mL ずつ播種した。37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 5 日間培養した後に、位相差顕微鏡にて観察した（図 1）。観察した結果を表 2 に示した。

なお、表中の記号は以下の意味である。◎：分化するのに十分な大きさの胚様体が形成された。○：胚様体は形成されたが、大きさが十分でない。×：胚様体は形成されなかった。

【0043】

## マウス ES 細胞懸濁液の調製方法

## (1) フィーダー細胞の培養

フィーダー細胞として SIM マウスの繊維芽細胞（以下、STO 細胞と略記する）を用いた。STO 細胞は、25 units/mL ペニシリン、25 g/mL ストレプトマイシン及び、10 体積% 非動化处理したウシ胎児血清（以下、FCS と略記する）を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium（以下、DMEM 培地と略記する、Gibco 社製）を用い培養した。培養した STO 細胞を 10 g/mL のマイトマイシン C 溶液（Sigma 社製）で 3 時間処理した後、細胞懸濁液とした。STO 細胞の懸濁液を各ウェルに  $5 \times 10^5$  cells になるように 6 穴マルチディッシュに播種した。37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 16 時間培養してフィーダー細胞を調製した。

## (2) マウス胚性幹細胞の培養

胚性幹細胞として、129V マウス胚性幹細胞（以下、マウス ES 細胞と略記する）を用いた。ES 細胞の培地は、15% KnockOut™ serum

replacement (KSR: Gibco社製)、1mMピルビン酸ナトリウム (Gibco社製)、0.1mM nonessential amino acids (Gibco社製)、0.1mM 2-メルカプトエタノール (Sigma社製)、25units/mLペニシリン、25g/mLストレプトマイシン及び、1,000units/mLのmurine leukemia inhibitory factor (mLIF; Chemicon社製)を含むDMEM培地(以下、ES培地と略記する)とした。前記(1)で調製したフィーダー細胞上に $2 \times 10^5$  cell/wellのES細胞を播種した。37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で3日間、マウスES細胞を培養した。

### (3) マウス胚性幹細胞懸濁液の調製

前記(2)で培養したマウスES細胞を0.1%トリプシン-EDTAで常法により剥がした後、15%FCS、0.1mM 2-メルカプトエタノール (Sigma社製)、25units/mLペニシリン及び、25g/mLストレプトマイシンを含むIscove's modified Dulbecco's medium (IMDM培地、Gibco社製、ただし、mLIFを含まない。)に懸濁して、 $2 \times 10^4$  cells/mLのマウスES細胞懸濁液を調製した。

### 【0044】

#### 実施例2-2及び2-3

実施例2-1で用いた実施で調製した胚様体形成容器Aの代わりに、実施例2-2及び、実施例2-3で調製した胚様体形成容器B及び、胚様体形成容器Cを用いた以外は、実施例2-1と同様に実験を行った。観察した結果を表2に示した。

### 【0045】

#### 比較例2-1

実施例2-1で用いた胚様体形成容器Aの代わりに、未処理のポリスチレン製96穴プレートを用いた以外は、実施例2-1と同様に実験を行った。観察した結果を表2及び図2に示した。

### 【0046】

## 比較例 2-2

平底ポリスチレン製 96 穴プレート各ウェルにリン酸緩衝液 130  $\mu$ L 及び、ミネラルオイル 200  $\mu$ L を予め入れておき、ここに前記の調製した  $2 \times 10^4$  cells/mL のマウス ES 細胞懸濁液を 50  $\mu$ L 播種した。37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 5 日間培養した後に、形成された胚様体を U 底ポリスチレン製 96 穴プレートに移した後に、位相差顕微鏡にて観察した。観察した結果を表 2 及び図 3 に示した。

【0047】

## 比較例 2-3

実施例 2-1 で用いた実施例 1-1 で調製した胚様体形成容器 A の代わりに、スミロンセルタイトスフェロイド（96 穴プレート、登録商標、住友ベークライト社製）を用いた以外は、実施例 2-1 と同様に実験を行った。観察した結果を表 2 に示した。

【0048】

【表 2】

表 2

	容 器	胚様体の形成
実施例 2-1	胚様体形成容器 A	◎
実施例 2-2	胚様体形成容器 B	◎
実施例 2-3	胚様体形成容器 C	◎
比較例 2-1	未処理プレート	×
比較例 2-2	ハンギング・ドロップ法	○
比較例 2-3	スフェロイドプレート	○

【0049】

## 実施例 3-1～実施例 3-3

実施例 2-1～2-3 で得られた胚様体を 0.1 mL の培地ごと吸出し、下記に調製したゼラチンコートディッシュに移した。培地交換は 3 日毎に半量の交換を行った。37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 7 日間培養した後に、位相差顕微鏡にて観察した。結果を表 3 に示した。

なお、表中の記号は以下の意味である。◎：拍動している心筋が観察された。  
○：拍動している心筋が僅かに観察された。×： 作業が行えなかった。

## 【0050】

## ゼラチンコートディッシュの調製

121℃、20分間オートクレーブ滅菌を施した0.1重量%のゼラチン水溶液を培養用24穴マルチディッシュに均一に加えた。冷蔵保存を行い、使用直前に、アスピレーターにてゼラチン溶液を吸引した。15% FCS、0.1mM 2-メルカプトエタノール (Sigma社製)、25units/mL ペニシリン及び、25g/mL ストレプトマイシンを含む Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM培地、Gibco社製、ただし、mLIFを含まない。) を各ウェルに1mLずつ加えた。

## 【0051】

## 比較例3-1

比較例2-1のプレート底部に接着した細胞をゼラチンコートディッシュに移そうとしたが移せなかった。

## 【0052】

## 比較例3-2及び、比較例3-2

比較例2-2 (比較例3-2)、比較例2-3 (比較例3-3) で得られた胚様体を用いた以外は、実施例3-1と同様に実験を行った。観察した結果を表3に示した。

## 【0053】

【表3】

表3

	容 器	心筋への分化
実施例3-1	胚様体形成容器A	◎
実施例3-2	胚様体形成容器B	◎
実施例3-3	胚様体形成容器C	◎
比較例3-1	未処理プレート	×
比較例3-2	ハンギング・ドロップ法	○
比較例3-3	スフェロイドプレート	○

## 【0054】

表1の結果より、実施例1-1～1-3においてP/Cの値が0.038～0.074であることから、本発明の胚様態形成容器がホスホリルコリン類似基に

より被覆された構造であることがわかる。

表 2 の結果より、本発明の胚様態形成容器でマウス E S 細胞を培養すると、良好に胚様態を形成できることがわかる。

表 3 の結果より、本発明の胚様態形成容器で形成されたマウス E S 細胞の胚様態は、心筋への分化能が高いことがわかる。

なお、図 1 は本発明の胚様形成容器でのマウス E S を 5 日間培養した後に観察した写真である。分化するのに十分な大きさの胚様体が形成されている。図 2 は未処理のポリスチレン製容器の場合であるが胚様体は形成されていない。図 3 はハンギング・ドロップ法で形成した胚様体であるが、大きさは十分でなかった。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、胚様体形成容器 A で形成した胚様体の位相差顕微鏡写真である。

【図 2】

図 2 は、未処理プレートでの位相差顕微鏡写真である。

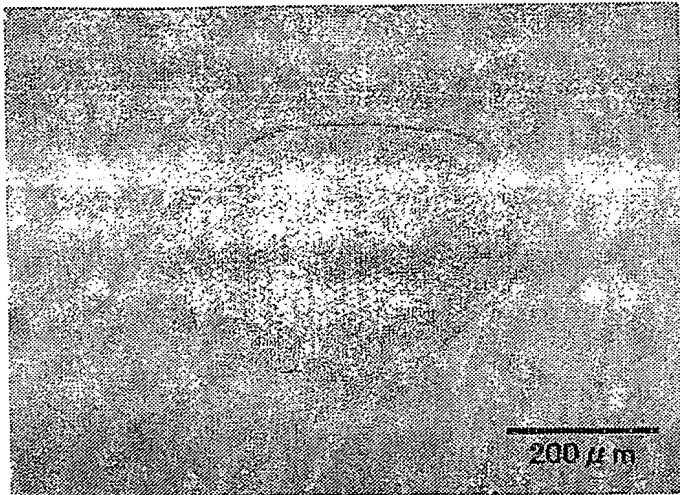
【図 3】

図 3 は、ハンギング・ドロップ法で形成した胚様体の位相差顕微鏡写真である。

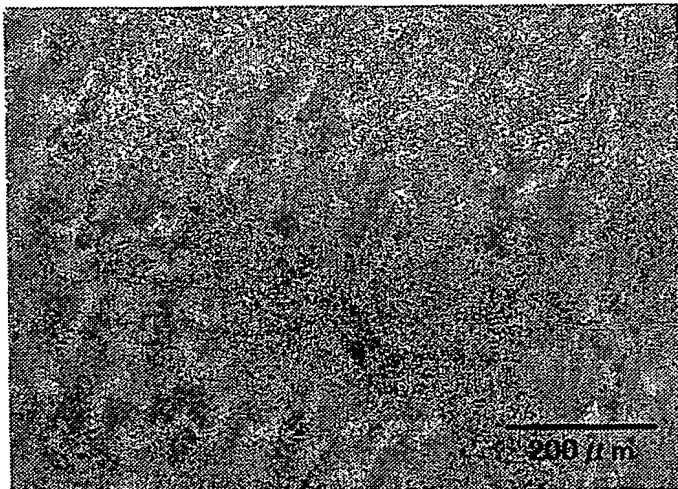
。

【書類名】 図面

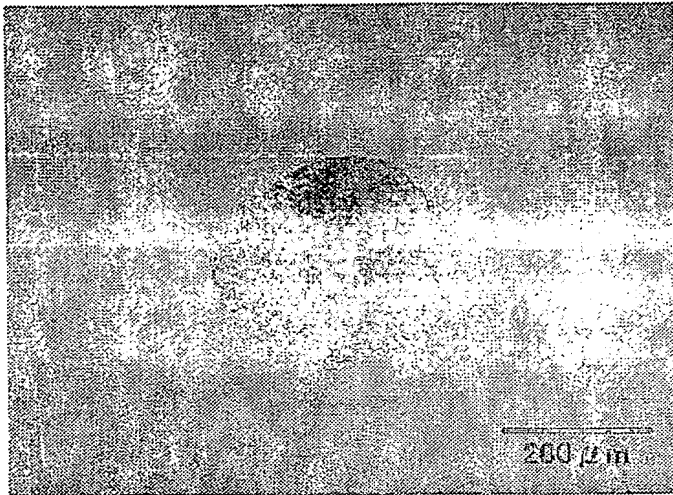
【図 1】



【図 2】



【図 3】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

煩雑な手法を用いることなく、容易に胚性幹細胞より胚様体を形成するために使用する胚様体形成容器を提供する。さらに、煩雑な手法を用いることなく、容易に胚性幹細胞を培養し胚様体を形成できる胚様体形成方法を提供する。

【解決手段】

胚性幹細胞を浮遊培養させ胚様態を形成させるために使用される胚様態形成容器において、胚性幹細胞及び／又は胚様態と接する容器の表面が特定のホスホリルコリン類似基により被覆された構造である胚様態形成容器。前記の胚様体形成容器中で、胚性幹細胞を浮遊培養することを特徴とする胚様体形成方法。

【選択図】 なし



認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-181342
受付番号	50301059400
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成15年 6月26日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 6月25日

次頁無

出証特 2004-3058615

特願 2 0 0 3 - 1 8 1 3 4 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 4 3 4 1 ]

1. 変更年月日 1 9 9 4 年 1 1 月 9 日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都渋谷区恵比寿四丁目 2 0 番 3 号

氏 名 日本油脂株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**